

## MODIFIED AMINO ACID AMIDASE AND METHOD FOR D-AMINO ACID PRODUCTION USING THE SAME

**Publication number:** JP2002253256 (A)

**Publication date:** 2002-09-10

**Inventor(s):** ASANO YASUHISA

**Applicant(s):** MITSUBISHI RAYON CO

**Classification:**

- international: **C12N15/09; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10; C12N9/80; C12P41/00; C12R1/01; C12N15/09; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10; C12N9/78; C12P41/00; (IPC1-7): C12N15/09; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10; C12N9/80; C12P41/00; C12N15/09; C12R1/01**

- European:

**Application number:** JP20010058015 20010302

**Priority number(s):** JP20010058015 20010302

### Abstract of JP 2002253256 (A)

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To obtain a modified D-amino acid amidase having ameliorated properties better than those of a wild type enzyme and to provide an efficient method for D-amino acid production. **SOLUTION:** This modified d-amidase in which at least one or more amino acid residues of an amino acid sequence constituting a wild type D-amino acid amidase are substituted with different residues selected from a group of natural amino acids is obtained. A D- $\alpha$ -amino acid is produced from an  $\alpha$ -amino acid amide of racemic isomer by using the modified D-amidase. The D- $\alpha$ -amino acid can be efficiently produced.

---

Data supplied from the esp@cenet database — Worldwide



(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号  
特開2002-253256,  
(P2002-253256A)

(43)公開日 平成14年9月10日(2002.9.10)

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	キーワード*(参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 1/15	4 B 0 2 4
1/15		1/19	4 B 0 5 0
1/19		1/21	4 B 0 6 4
1/21		9/80	4 B 0 6 5
5/10		C 1 2 P 41/00	A
審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 9 頁) 最終頁に続く			

(21)出願番号 特願2001-58015(P2001-58015)

(22)出願日 平成13年3月2日(2001.3.2)

(71)出願人 000006035

三菱レイヨン株式会社

東京都港区港南一丁目6番41号

(72)発明者 浅野 泰久

富山県富山市千石町2丁目6-4-803

Fターム(参考) 4B024 BA11 CA04 DA02 DA05 DA11

EA04 GA11 HA01 HA03

4B050 CC01 CC03 CC04 DD02 LL05

4B064 AE03 CA19 CB05 CC24

4B065 AA01X AA01Y AA57X AA87X

AB01 BA01 CA31

(54)【発明の名称】 改変型アミノ酸アミダーゼとそれを用いたD-アミノ酸の製造方法

(57)【要約】

【課題】 野生型酵素と比較して、諸性質が改善された改変型D-アミノ酸アミダーゼの提供と、それを用いた効率の良いD-アミノ酸の製造方法。

【解決手段】 野生型D-アミノ酸アミダーゼを構成するアミノ酸配列のアミノ酸残基のうち少なくとも一つ以上が天然アミノ酸のグループから選択される、異なる残基で置換されている改変型D-アミダーゼ。またその改変型D-アミダーゼを用いて、ラセミ体 $\alpha$ -アミノ酸アミドからD- $\alpha$ -アミノ酸を製造する。

【効果】 効率良くD- $\alpha$ -アミノ酸を製造することができる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号1記載のアミノ酸配列を含むタンパク質において、1もしくは複数のアミノ酸残基が、欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、且つD-アミノ酸アミダーゼ活性を有するタンパク質。

【請求項2】 配列番号1記載のアミノ酸配列を含むタンパク質において、278位のリジン残基及び303位のグルタミン酸残基のうち少なくとも一つが天然アミノ酸のグループから選択される、異なるアミノ酸残基で置換されており、且つD-アミノ酸アミダーゼ活性を有するタンパク質。

【請求項3】 配列番号1記載のアミノ酸配列を含むタンパク質において、少なくとも278位のリジン残基がL-メチオニン残基に置換されており、且つD-アミノ酸アミダーゼ活性を有するタンパク質。

【請求項4】 配列番号1記載のアミノ酸配列を含むタンパク質において、少なくとも303位のグルタミン酸残基がL-バリン残基に置換されており、且つD-アミノ酸アミダーゼ活性を有するタンパク質。

【請求項5】 配列番号1記載のアミノ酸配列を含むタンパク質において、少なくとも278位のリジン残基がL-メチオニン残基、及び303位のグルタミン酸残基がL-バリン残基に置換され、且つD-アミノ酸アミダーゼ活性を有するタンパク質。

【請求項6】 請求項1～5の少なくとも1項に記載されたタンパク質をコードする遺伝子。

【請求項7】 請求項6記載の遺伝子をベクターDNAに挿入した組換えDNA。

【請求項8】 請求項7記載の組換えDNAを含む形質転換体。

【請求項9】  $\alpha$ -アミノ酸アミドを立体選択的に加水分解する能力を有する触媒を用いてD- $\alpha$ -アミノ酸を製造する方法において、触媒が請求項8記載の形質転換体又は該処理物であることを特徴とするD- $\alpha$ -アミノ酸の製造方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、改変型D-アミノ酸アミダーゼ、それらの製造手段及び方法、並びにD- $\alpha$ -アミノ酸の生産におけるそれらの使用に関する。D- $\alpha$ -アミノ酸は生理活性物質の原料として有用な化合物である。

## 【0002】

【従来の技術】光学活性な $\alpha$ -アミノ酸の製造に関する報告は化学的合成法、生物学的合成法ともに数多く見られる。特にD- $\alpha$ -アミノ酸は発酵技術による工業的規模での大量生産が困難であることから、効率の良い合成法の開発が強く望まれている。例えば、D- $\alpha$ -アミノ酸の生物学的合成法として、立体特異的な $\alpha$ -アミノ酸アミド加水分解能を有する菌体もしくは酵素を用いたラセミ

体 $\alpha$ -アミノ酸アミドの光学分割法が報告されている

(特開昭60-184392、特開昭61-96989、特開昭61-274690、特開昭63-87998、特開平1-2254842、特開平2-234678、特開平9-510623)。この方法は原料となるラセミ体 $\alpha$ -アミノ酸アミドの製造が容易であり、多種の光学活性D- $\alpha$ -アミノ酸製造に応用が可能であること、また、選択性の高い菌体または酵素の取得により光学的に純粋なD- $\alpha$ -アミノ酸が容易に製造可能であることなどの理由により、D- $\alpha$ -アミノ酸の汎用的な製造法として有用である。

【0003】しかし、過去のラセミ体 $\alpha$ -アミノ酸アミドの光学分割法によるD- $\alpha$ -アミノ酸の合成法においては、いずれも使用している $\alpha$ -アミノ酸アミド加水分解菌または酵素の触媒能力について工業的規模で満足できる能力を有しているものは報告されておらず、より生産性、熱安定性など諸性質が改善され触媒能力が向上した $\alpha$ -アミノ酸アミド加水分解菌または酵素が求められていた。

【0004】 $\alpha$ -アミノ酸アミド加水分解菌または酵素の改善方法としては、加水分解能力を有する菌体を培養する際に培地に窒素源としてアミド類を添加しD-体選択的なアミノ酸アミダーゼの活性発現を促進する方法(特開昭61-187788)、培養菌体をキレート剤で処理を行なう方法(特開平1-265896)、反応液中にメルカプト基を有する化合物を存在させる方法(特開平1-262798)が報告されている。

【0005】しかしながら、上記の方法は酵素の触媒活性のみしか改善されておらず、かつその効果も製造コストを格段に低下させるほどのものでは無い。また熱安定性、生産能力等の性質改善については全く記載されておらず、従って上記の方法を用いたことで工業的に優位な $\alpha$ -アミノ酸アミド加水分解菌または酵素の触媒が得られたとは言い難い。従って実用的なD- $\alpha$ -アミノ酸製造方法に使用できる能力を有した、 $\alpha$ -アミノ酸アミドを立体選択的に加水分解する酵素の報告はない。

【0006】以上の理由から、公知の手法による $\alpha$ -アミノ酸アミド加水分解菌または酵素を用いたD- $\alpha$ -アミノ酸製造方法は、用いる触媒、 $\alpha$ -アミノ酸アミド加水分解菌または酵素、の性質、能力の面で問題があるため工業的に優位な方法となり得えず、生産能力、熱安定性などの諸性質が改善された触媒が求められていた。

## 【0007】

【発明が解決しようとする課題】したがって、本発明は上記種々の問題点を解決し、触媒活性、熱安定性及び生産能力などの諸性質が改善された改変型D-体選択的アミノ酸アミダーゼとその製造手段、及び改変型D-体選択的アミノ酸アミダーゼを用いた工業的に優位性のあるD- $\alpha$ -アミノ酸の製造方法を提供するものである。

## 【0008】

【課題を解決するための手段】近年遺伝子工学技術の進



歩により、蛋白質アミノ酸配列を人為的に改変することによって、蛋白質の持つ諸性質をより工業的に優位に改変することが可能となってきた。本発明者は上記課題の解決のために鋭意検討し、オクロバクトラム・アンスロピ由来のD-体選択的アミノ酸アミダーゼ遺伝子（Eur. J. Biochem. 267, 2028-2035(2000)記載）の遺伝子改変を行った結果、触媒活性、熱安定性及び生産能力が向上した改変型D-選択的アミノ酸アミダーゼ等が得られること等を見だし、本発明に到達した。

【0009】すなわち本発明は、（1）配列番号1記載のアミノ酸配列を含むタンパク質において、1もしくは複数のアミノ酸残基が、欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、且つD-アミノ酸アミダーゼ活性を有するタンパク質。（2）配列番号1記載のアミノ酸配列を含むタンパク質において、278位のリジン残基及び303位のグルタミン酸残基のうち少なくとも一つが天然アミノ酸のグループから選択される、異なるアミノ酸残基で置換されており、且つD-アミノ酸アミダーゼ活性を有するタンパク質。（3）配列番号1記載のアミノ酸配列を含むタンパク質において、少なくとも278位のリジン残基がL-メチオニン残基に置換されており、且つD-アミノ酸アミダーゼ活性を有するタンパク質。（4）配列番号1記載のアミノ酸配列を含むタンパク質において、少なくとも303位のグルタミン酸残基がL-バリン残基に置換されており、且つD-アミノ酸アミダーゼ活性を有するタンパク質。（5）配列番号1記載のアミノ酸配列を含むタンパク質において、少なくとも278位のリジン残基がL-メチオニン残基、及び303位のグルタミン酸残基がL-バリン残基に置換され、且つD-アミノ酸アミダーゼ活性を有するタンパク質。（6）、（1）～（5）の少なくとも1項に記載されたタンパク質をコードする遺伝子。（7）、上記（1）～（6）のいずれかの遺伝子を利用したD- $\alpha$ -アミノ酸の製造方法、である。

【0010】

【発明の実施の形態】以下に本発明を詳細に説明する。

【0011】本発明の改変型アミノ酸アミダーゼは、例えば、以下のようにして得ることができる。まず、改変前の野生型D-体選択的アミノ酸アミダーゼ遺伝子は、Ochrobactrum属に属する微生物から単離することができ、その具体例は、Ochrobactrum anthropi SV3 である。目的とする遺伝子の単離法は、文献に詳細に記載されている（Eur. J. Biochem. 267, 2028-2035(2000)）。この方法によって、取得された遺伝子の塩基配列は公知の方法によって分析することができ、配列番号1記載のアミノ酸配列が決定された。尚、野生型D-体選択的アミノ酸アミダーゼ遺伝子を含むプラスミドpDAは、産業技術総合研究所生命工学工業技術研究所（茨城県つくば市東1丁目1番3号）に、平成13年3月1日付けで、識別番号pDA、受託番号FERM P-18236として寄託されている。また、そのアミノ酸アミダーゼのアミノ酸および遺伝子情

報は、National Center for Biotechnology Information (NCBI) のホームページから調べることができる。

【0012】改変型アミノ酸アミダーゼを取得するためには、該遺伝子への変異導入、例えば、部位特異的変異導入やランダム変異誘発のような公知の変異導入技術を利用することができる。特に、ランダム変異誘発は、PCR (polymerase chain reaction) 技術を利用することで、容易に達成することができる。

【0013】本発明の改変型D-体選択的アミノ酸アミダーゼは、野生型D-体選択的アミノ酸アミダーゼのアミノ酸配列の278、および303位のうち少なくとも一つのアミノ酸残基が天然アミノ酸のグループから選択される異なるアミノ酸残基で置換されていることで特徴付けられる。

【0014】本発明の好ましい改変型D-体選択的アミノ酸アミダーゼは、278位のリジン残基からL-メチオニン残基、および303位のグルタミン酸残基からL-バリン残基へのアミノ酸残基の置換のうち少なくとも一つの置換が存在するものであり、より好ましくは、303位のグルタミン酸残基がL-バリン残基に置換されているもの、あるいは、278位のリジン残基がL-メチオニン残基に置換され、かつ303位のグルタミン酸残基がL-バリン残基に置換されている改変型D-体選択的アミノ酸アミダーゼである。

【0015】本発明の改変型D-体選択的アミノ酸アミダーゼの製造法には特に限定は無く、任意の公知の方法を実施することが可能であり、最終的に目的とする改変型D-体選択的アミノ酸アミダーゼが得られればその製造方法は特に制限されるものではない。例えば、野生型D-体選択的アミノ酸アミダーゼを化学的手法で直接改変する事も可能である。また変異型D-体選択的アミノ酸アミダーゼに相当する遺伝子を野生型D-体選択的アミノ酸アミダーゼへの点突然変異の導入または完全化学合成法により作成し、その遺伝子で形質転換された任意の細胞に生産させることも可能である。なお、本発明の改変型D-体選択的アミノ酸アミダーゼは野生型D-体選択的アミノ酸アミダーゼのアミノ酸配列の278、および303位のうち少なくとも一つの残基が他のアミノ酸に置換されていれば良く、その他のアミノ酸配列が一部欠損・挿入されていても、また他の部位にアミノ酸置換が行なわれていても本発明の範囲内である。

【0016】本発明の組換えDNAは、適当なベクターに本発明の遺伝子を挿入（連結）することにより得ることができる。本発明の遺伝子を挿入するためのベクターは、宿主中で複製可能なものであれば特に限定されず、例えば、プラスミドDNA、ファージDNA等が挙げられる。プラスミドDNAとしては、大腸菌由来のプラスミド（例えば、pBR322、pBR325、pUC118、pUC18、pUC19等）、枯草菌由来のプラスミドのプラスミド（例えば、pUB110、pTP5等）、酵母由来のプラスミド（例えば、YEp13、YEp

24、Ycp50等)などが例示できる。ファージDNAとしては、 $\lambda$ ファージ等が挙げられる。さらに、レトロウィルス又はワクシニアウィルスなどの動物ウィルス、バキュロウィルスなどの昆虫ウィルスベクターを用いることもできる。ベクターへの本発明の遺伝子の挿入は、まず、精製されたDNAを適当な制限酵素で切断し、同じ制限酵素で切断したベクターDNAに連結することにより行うことができる。

【0017】本発明の遺伝子は、各宿主細胞中で遺伝子の発現が行われるようにベクターに組み込まれることが必要である。そこで、本発明のベクターには、本発明の遺伝子の他、プロモーター、所望によりエンハンサーなどのシスエレメント、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、リボソーム結合配列(SD配列)などを考慮して配置することが好ましい。大腸菌を宿主とする場合のプロモーターとしては、trpプロモーター、lacプロモーター、P<sub>1</sub>プロモーター、P<sub>6</sub>プロモーターなどが挙げられる。また、tacプロモーターなどのように、人為的に設計改変されたプロモーターを用いても良い。また、酵母を宿主とする場合のプロモーターとしては、gal11プロモーター、gal10プロモーター、ヒートショックタンパク質プロモーター、MF $\alpha$ 1プロモーター、PH05プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーター、AOX1プロモーターなどが挙げられる。動物細胞を宿主とする場合のプロモーターとしては、該動物細胞中で発現できる物であれば特に限定されず、例えば、SR $\alpha$ プロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMVプロモーター等が挙げられる。なお、選択マーカーとしては、導入する宿主に応じて、アンピシリン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子等を適宜使用することができる。

【0018】本発明の形質転換体は、本発明の組換えDNAを、目的遺伝子が発現し得るように宿主中に導入することにより得ることができる。ここで、宿主としては、本発明のDNAを発現できるものであれば特に制限はなく、例えば、大腸菌(*Escherichia coli*)、枯草菌(*Bacillus subtilis*)等の細菌、サッカロマイセス・セルビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)、シゾサッカロマイセス・ポンベ(*Schizosaccharomyces pombe*)、ピチア・パストリス(*Pichia pastoris*)等の酵母、サル細胞COS-7、Vero、チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO細胞)、マウスL細胞、ラットGH3、ヒトFL細胞等の動物細胞、Sf9細胞、Sf21細胞等の昆虫細胞が挙げられる。

【0019】大腸菌への組換えDNAの導入は、カルシウムイオンを用いる方法[Cohen, S.N.ら *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69:2110 (1972)]、エレクトロポレーション法などにより行うことができる。酵母への組換えDNAの導入は、エレクトロポレーション法[Becker D.

M.ら *Methods. Enzymol.*, 194:182 (1990)]、スフェロプラスト法[Hinnen A.ら *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:1929 (1978)]、酢酸リチウム法[Itoh, H.ら *J. Bacteriol.*, 153:163 (1983)]などの方法により行うことができる。さらに、動物細胞への組換えDNAの導入方法としては、例えばエレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法等が挙げられる。

【0020】前記組換えDNAが導入された形質転換体を、 $\alpha$ -アミノ酸アミドを立体選択的に加水分解しD- $\alpha$ -アミノ酸に変換する触媒として利用するには、前記組換えDNAが導入された形質転換体を培養する必要がある。大腸菌や酵母等の形質転換体を培養する培地としては、当該微生物が資化する炭素源、窒素源、無機塩類を含有し、形質転換体の培養を効率的に行える培地であればいずれでも構わない。炭素源としては、グルコース、フラクトース、スクロース、デンプン等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノール等のアルコール類が用いられる。窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸塩若しくは有機酸のアンモニウム塩又はその他の含窒素化合物の他、ペプトン、肉エキス、コーンステープリカー等が用いられる。無機物としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等が用いられる。前記微生物の培養は、通常、振とう培養又は通気攪拌培養などの好気的条件下、37°Cで6~24時間行う。培養中は、pHが7.0~7.5に保持する。pHの調整は、無機又は有機酸、アルカリ溶液等を用いて行う。培養中は必要に応じてアンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加しても良い。また、動物細胞の形質転換体を培養する培地としては、RPMI1640培地、DMEM培地又はこれらの培地に牛胎児血清等を添加した培地等が用いられる。動物細胞の培養は、通常、5% CO<sub>2</sub>存在下、37°Cで1~30日行う。培養中は必要に応じてカナマイシンやペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【0021】なお、誘導性のプロモーターを含む発現ベクターで形質転換された形質転換体を培養する場合は、インデューサーを培地に添加することによってプロモーターの下流のタンパク質を誘導する。例えば、lacプロモーターを含む発現ベクターで形質転換された形質転換体を培養する場合には、イソプロピル- $\beta$ -D-チオガラクトピラノシド(IPTG)等を、trpプロモーターを含む発現ベクターで形質転換した形質転換体を培養する場合には、インドールアクリル酸(IAA)等を培地に添加することで目的のタンパク質の発現を誘導する。

【0022】培養後、本発明のアミノ酸アミダーゼが細胞内又は細胞外に蓄積する。前記アミダーゼを $\alpha$ -アミ



ノ酸アミドからD- $\alpha$ -アミノ酸への変換反応に利用するには、通常的手段、例えば、遠心分離、濾過等により、細胞及び培養上清を分離し、該細胞、細胞処理物又は培養上清を前記変換反応の触媒として利用する。

【0023】前記反応は、水性媒体中において $\alpha$ -アミノ酸アミドを上記細胞またはその処理物と接触させることによって行われる。細胞はそのまま反応に利用しても良いし、また適当な処理を施しても良い。該処理の方法としては、細胞を適当な担体（アクリルアミドポリマー、アルギニン、アガロース等）に固定化する方法、細胞を破碎して粗酵素とする方法等が挙げられる。通常、 $\alpha$ -アミノ酸アミド濃度は0.1～60重量%、好ましくは1～40重量%、細胞または細胞処理物の濃度は、その活性量により異なるがアミノ酸アミド重量に対し1/10000～1/2重量、好ましくは1/1000～1/10重量、反応液のpHは4～11、好ましくは6～10、および反応温度は10～60°C、好ましくは20～50°Cである。

【0024】

【実施例】次に、本発明を実施例により具体的に説明する。ただし、本発明は以下の実施例によって制限されるものではない。

【0025】（実施例1）

（1）変異操作

*Ochrobactrum anthropi* SV3由来のD-体選択的アミダーゼ遺伝子を含む組み換え体プラスミドpDAAを、エラー頻度が高いPCR法（Error prone PCR）〔Cadwell and Joyceの方法（PCR Methods and Application, 3, S136-S140, 1994）〕によって複製し、大腸菌JM109を形質転換後、形質転換株を得た。Error prone PCRの反応液（50 $\mu$ L）は、12.5 $\mu$ Lの蒸留水、5 $\mu$ LのMgCl<sub>2</sub>を含まない10 $\times$  Taq 緩衝液5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM MnCl<sub>2</sub>, 0.2 mM のdATP と dGTP, 1 mM のdCTP と dTTP, 1 $\mu$ M の二種類のプライマー、2.5 U Taq DNA ポリメラーゼおよび500 ng のpDAAを鋳型として含んでいた。95°C の変性ステップを30分（最初のサイクルのみは5分）、55°Cのアニーリングを1.5分間、72°Cの伸長を1分間、そして72°Cに10分間保温した。このサイクルを30回行った。増幅されたPCR産物は、HindIIIおよびXbaIで切断後、アガロースゲル、次いで、QIAquick ゲル精製キットを用いて精製した。増幅されたDNAはpUC19のlac プロモーターの下流に挿入し、常法により大腸菌JM 109を形質転換した。

【0026】（2）耐熱性向上変異株のスクリーニング

大腸菌形質転換株は、LB 寒天平板培地上のニトロセルロースフィルター上に塗布された。合計約10000個のコロニーが出現したニトロセルロースフィルター数枚を、それぞれ10 mg/mlのリゾチーム液、10  $\mu$ molの EDTA (pH 6.0) を含む1mlの液に下からひたし、30°Cで30分間保温することにより、スフェロプラストを作った。さら

にこれらのフィルターは、-20°Cで凍結及び室温における融解を1サイクルとし、3サイクル行い、酵素を溶出させた。これらのフィルターを、そのまま、45°Cで15分間保温した後、D-アミノ酸アミドから生成するD-アミノ酸をD-アミノ酸オキシダーゼの反応によって検出した（Ikenakaら、Biosci. Biotechnol. Biochem. 62 1668-1671, 1998）。10分間の反応の後、赤く発色したコロニーを耐熱性の向上した変異株として単離した。この変異株をLB培地で培養し、菌体を各種の温度で保温後、耐熱性の向上を確認した。このようにして、変異株B29を得た。次に、変異株B29から常法により単離した変異型遺伝子を含むプラスミドpDAA-B29を鋳型として、さらに変異を重ねた。実施例1（1）記載と同様にしてError prone PCRを行い、約40000個のコロニーを50°Cで15分間保温することにより、変異株BFB40を得た。変異株BFB40から常法により変異型遺伝子を含むプラスミドpDAA-BFB40を単離した。

【0027】（3）変異箇所の解析

上記のように得られた耐熱性が向上した変異型酵素遺伝子について、どの部位が変異を受けているかを次に解析した。大腸菌形質転換株から、変異遺伝子を常法により精製した。該組み換え体DNAに含まれる変異を受けた改変D-体選択的アミダーゼ遺伝子の塩基配列を、4000L DNA sequencer（Li-Cor社製）を用いて決定した。その結果、該塩基配列をコードするアミノ酸配列を野生型D-体選択的アミダーゼと比較したところ、変異株B29においては、303位のグルタミン酸残基(GAA)がバリン残基(GTA)に置換されていた。変異株BFB40においては、さらに278位のリジン残基(AAG)がメチオニン残基(TAG)に置換されていた。

【0028】（実施例2）LB培地（pH7.2）5mlを試験管に分注してオートクレーブ滅菌した後、アンピシリンナトリウムを80 $\mu$ g/mlの濃度となるよう添加し、これに常法により形質転換した組換え体大腸菌を接種して37°Cにて12時間振とう培養した。LB培地（pH7.2）100mlを500ml容フラスコに分注してオートクレーブ滅菌した後、アンピシリンナトリウム80 $\mu$ g/ml、IPTG（isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside）0.5mMを添加し、これに上記培養液を1ml接種して37°Cにて8時間振とう培養した。菌体を遠心分離にて取得し、培養液と等量の0.9重量%NaCl水溶液で洗浄した後、5mlの0.1 M のTris/HCl(pH 8)に菌体を懸濁し、これを菌体懸濁液とした。野生株および耐熱性が向上した変異型大腸菌形質転換株、B29株、BFB40株の菌体懸濁液を各温度に15分間保温した後の酵素活性を図1に示した。酵素活性の測定は、次のように行った。20 $\mu$ モルのD-フェニルアラニンアミドを含む0.1 M のTris/HCl(pH 8)に適当量の菌体懸濁液を添加した反応液1mlで、30°C、5分間反応を行い、0.2mlの2 N HClO<sub>4</sub>を添加し反応を停止し、遠心により菌体を除いた。菌体を除いた反応液中のD-フェニルアラニン量は、ODS

カラム (Puresil C18 column, 4.6 x 150 mm, Waters, Japan) を着装した Waters 600 MS HPLC を用いて、溶媒として 5 mM potassiumphosphate (pH 3) - MeOH = 8 : 2 [vol/vol] を 0.7 ml/分の流速で流し、D-フェニルアラニンのピークを 254 nm で検出することにより定量した。尚、1 unit とは、1 分間に 1 μmol のフェニルアラニンを生成する酵素活性である。

【0029】(実施例3) 実施例2と同様に培養した変異型大腸菌形質転換株 BFB40 株と同野生株から、Eur. J. Biochem. 267, 2028-2035 (2000) 記載の方法に従いアミダーゼを電気泳動的に単一に精製した。さまざまな温度で野生株と BFB40 株の酵素の比活性を比較したところ、図2に示すように各温度において、活性が二倍以上向上し、特に最大活性のピークが野生株では、45℃であるのに対し、BFB40 株では、50℃であった。

【0030】(実施例4) 実施例2と同様の方法により、BFB40 株の菌体懸濁液を調製した。0.2g の D, L-フェニルアラニンアミドと 0.2ml の菌体懸濁液を含む 0.1 M の Tris/HCl (pH 8) 溶液 (1 ml) を 22 時間、30℃あるいは 40℃で振盪しながら D-フェニルアラニンの蓄積量反応を行った (170 回転/分)。30℃での反応で BFB40 株では、転換反応は良好に進行し、10重量%の D-フェニル \*

\* アラニンが生成した。生成した D-フェニルアラニンの ee は 98% であった。野生株では、5重量%の D-フェニルアラニンが生成した。また、40℃では、BFB40 株では、7重量%の D-フェニルアラニンが生成し、野生株では、3重量%の D-フェニルアラニンが生成した。

【0031】

【発明の効果】本発明により、改変型 D-体選択的アミノ酸アミダーゼ、特に触媒活性、熱安定性及び生産能力が向上した D-体選択的アミノ酸アミダーゼが効率良く製造できる。またこの改変型 D-体選択的アミノ酸アミダーゼをラセミ体 α-アミノ酸アミドの立体選択的加水分解反応に用いることで、D-α-アミノ酸の製造効率を向上させることができる。

【0032】

【図面の簡単な説明】

【図1】 野生株、B29 株、BFB40 株の耐熱性を比較した図である。

【図2】 野生株と BFB40 株の各温度での酵素の比活性について示した図である。

【0033】

【配列表】

# SEQUENCING LISTING

<110> MITSUBISHI RAYON CO., LTD.

<120> Improved amino acid amidase and process for producing D-amino acid using the amidase.

<130> P130095000

<160> 1

<210> 1

<211> 363

<212> PRT

<213> Ochrobacterium anthropi

<400> 1

Met Ser Asp Leu Asn Asn Ala Ile Gln Gly Ile Leu Asp Asp His Val

1 5 10 15

Ala Arg Gly Val Val Gly Val Ser Leu Ala Leu Cys Leu Pro Gly Glu

20 25 30

Glu Thr Ser Leu Tyr Gln Ser Gly Tyr Ala Asp Lys Phe Asn Lys Met

35 40 45

Pro Met Thr Gly Asp His Leu Phe Arg Ile Ala Ser Cys Thr Lys Ser

50 55 60

Phe Ile Ala Thr Gly Leu His Leu Leu Val Gln Asp Gly Thr Val Asp

65 70 75 80

Leu Asp Glu Pro Ile Thr Arg Trp Phe Pro Asp Leu Pro Lys Ala Ala

85 90 95

Gln Met Pro Val Arg Ile Leu Leu Asn His Arg Ser Gly Leu Pro Asp

100 105 110

Phe Glu Thr Ser Met Pro Met Ile Ser Asp Lys Ser Trp Thr Ala Gln

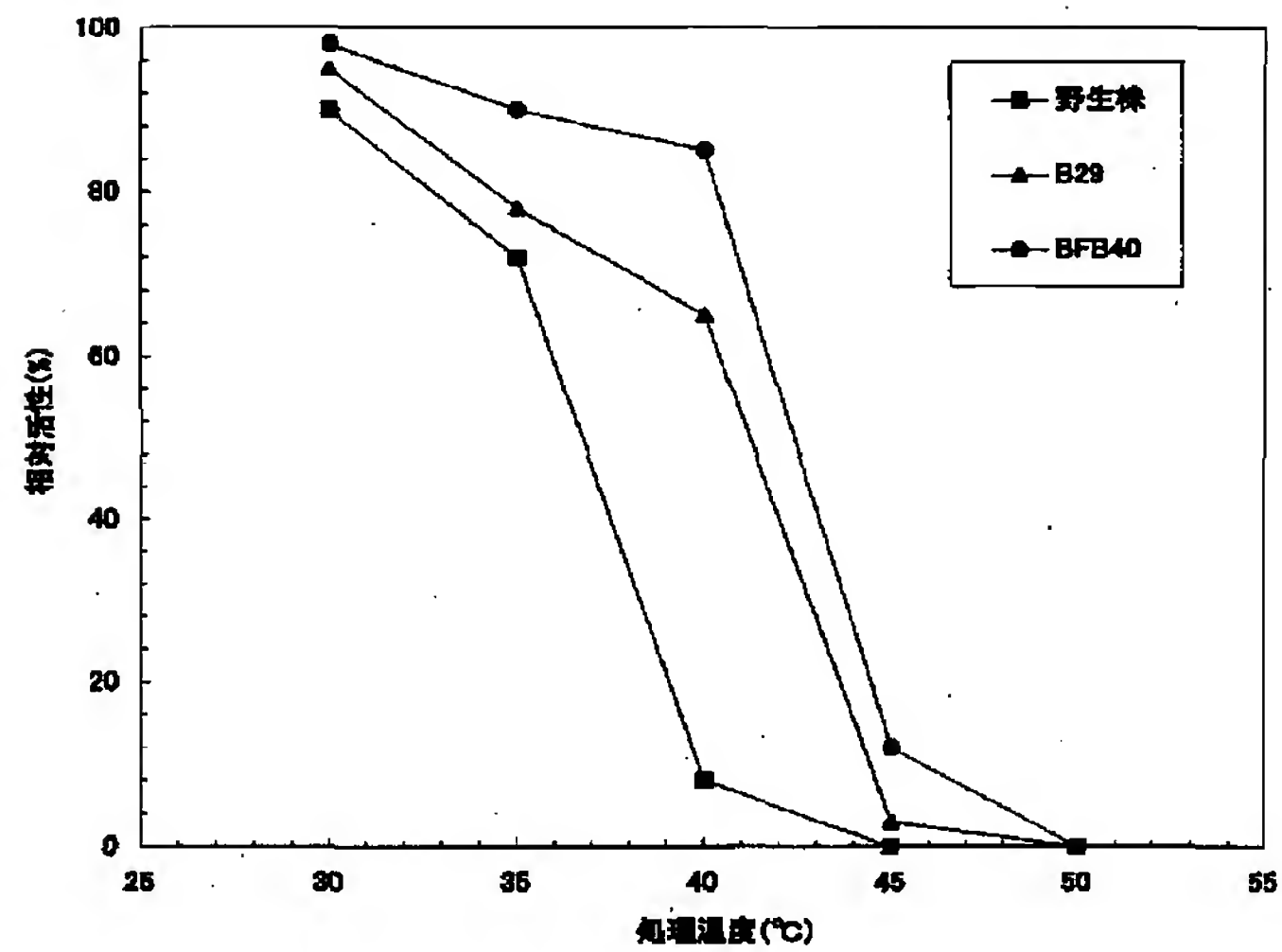
115 120 125

Glu Ile Val Asp Phe Ser Phe Arg His Gly Val Gln Lys Glu Pro Trp

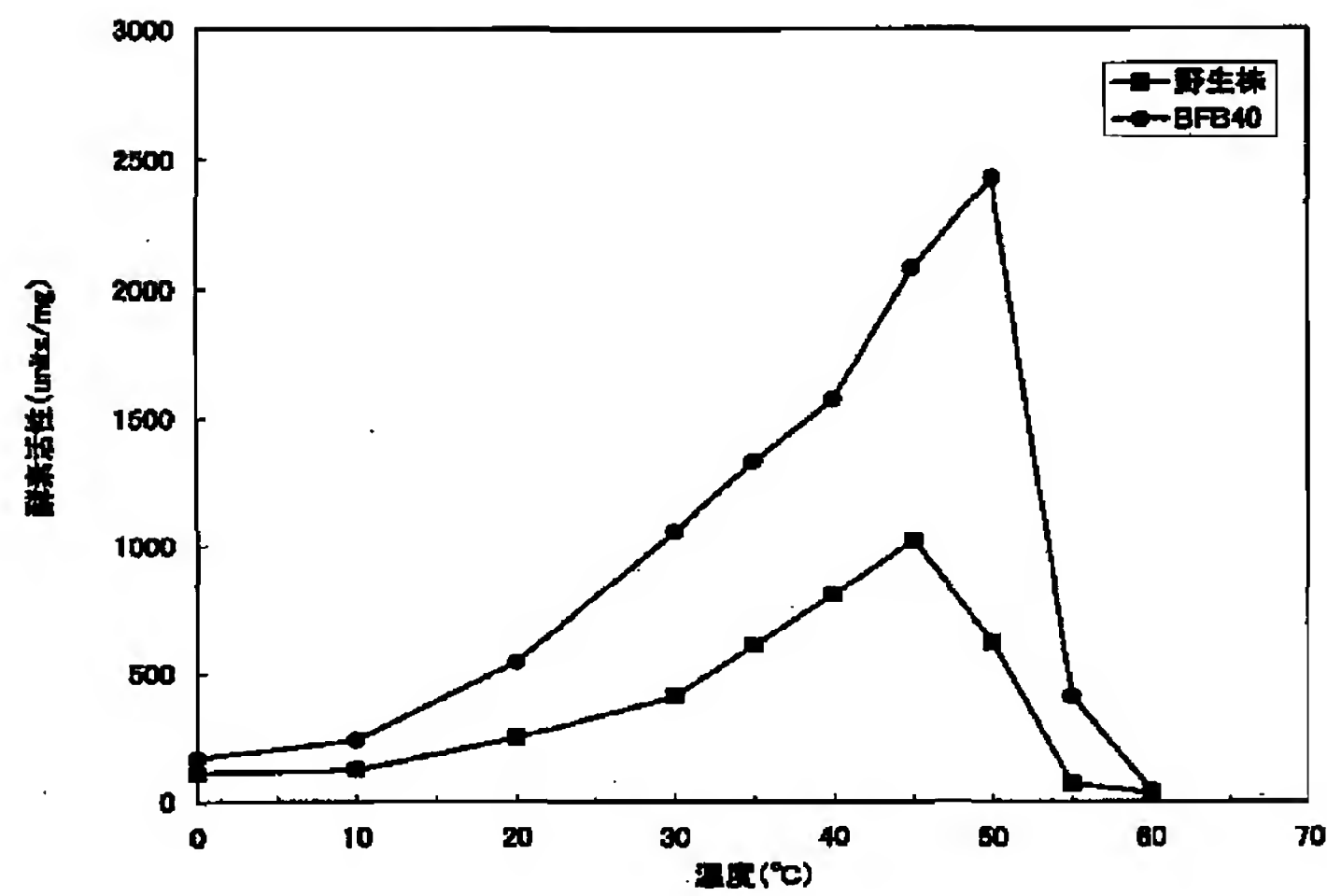


11  
 130 135 140  
 His Gly Met Glu Tyr Ser Asn Thr Gly Tyr Val Leu Ala Gly Met Ile  
 145 150 155 160  
 Ile Ala His Glu Thr Gly Lys Pro Tyr Ser Asp His Leu Arg Ser Arg  
 165 170 175  
 Ile Phe Ala Pro Leu Gly Met Lys Asp Thr Trp Val Gly Thr His Glu  
 180 185 190  
 Thr Phe Pro Ile Glu Arg Glu Ala Arg Gly Tyr Met His Ala Ala Ala  
 195 200 205  
 Asp Asp Glu Asn Pro Gln Trp Asp Val Ser Gly Ala Gly Asp Pro Val  
 210 215 220  
 Asp Gly Val Trp Asp Ser Thr Glu Trp Phe Pro Leu Ser Gly Ala Asn  
 225 230 235 240  
 Ala Ala Gly Asp Met Val Ser Thr Pro Arg Asp Ile Val Lys Phe Leu  
 245 250 255  
 Asn Ala Leu Phe Asp Gly Arg Ile Leu Asp Gln Lys Arg Leu Trp Glu  
 260 265 270  
 Met Lys Asp Asn Ile Lys Pro Ala Phe Phe Pro Gly Ser Asn Thr Val  
 275 280 285  
 Ala Asn Gly His Gly Leu Leu Leu Met Arg Tyr Gly Ser Ser Glu Leu  
 290 295 300  
 Lys Gly His Leu Gly Gln Ile Pro Gly His Thr Ser Ile Met Gly Arg  
 305 310 315 320  
 Asp Glu Glu Thr Gly Ala Ala Leu Met Leu Ile Gln Asn Ser Gly Ala  
 325 330 335  
 Gly Asp Phe Glu Ser Phe Tyr Leu Lys Gly Val Asn Glu Pro Val Asp  
 340 345 350  
 Arg Val Leu Glu Ala Ile Lys Asn Ser Arg Ser  
 355 360

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>7</sup>  
 C12N 9/80  
 C12P 41/00

識別記号

F I  
 C12R 1:01)  
 C12N 15/00

テーマコード(参考)

Z N A A

(9)

特開2002-253256

//(C 1 2 N 15/09 Z N A  
C 1 2 R 1:01)

5/00  
C 1 2 R 1:01)

A

